

Aus dem Hygienisch-Bakteriologischen Institut der Universität Bern
(Direktor: Prof. Dr. C. Hallauer)

Arbeit unter Leitung von Herrn P. D. Dr. B. Fust

Die antibakterielle Aktivität von Hirnextrakten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde eines Doctor pharmaciae
der Universität Bern

vorgelegt von

René Hofer, Apotheker

Biglen (Bern)

Aus dem Hygienisch-Bakteriologischen Institut der Universität Bern
(Direktor: Prof. Dr. C. Hallauer)

Arbeit unter Leitung von Herrn P. D. Dr. B. Fust

Die antibakterielle Aktivität von Hirnextrakten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde eines Doctor pharmaciae
der Universität Bern

vorgelegt von

René Hofer, Apotheker

Biglen (Bern)



Auf Antrag von Herrn Prof. Dr. Hallauer durch die Medizinische Fakultät zum Druck als
Dissertation genehmigt.

Bern, den 12. Juli 1950.

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
Prof. Dr. C. Hallauer

EINLEITUNG

Bekanntlich besitzt der Makroorganismus einige mehr oder minder unspezifische Schutzeinrichtungen, welche der Abwehr eindringender Mikroorganismen dienen. Derartige protektive Funktionen kommen nicht nur gewissen Körperflüssigkeiten sondern auch manchen Organen bezw. Geweben zu.

Bereits im Jahre 1886 stellte J. v. Fodor (1) fest, dass intravenös injizierte Subtilisbazillen und -sporen verhältnismässig rasch aus dem Kaninchenblute verschwinden. Analog verhalten sich Milzbrandbazillen (H. Conradi 2). G. Nuttall (3) zeigte, dass defibriniertes Kaninchenblut imstande ist, im Reagenzglas Milzbrand- und Heubazillen, nicht aber Staphylokokken abzutöten.

H. Buchner und M. Orthenberger (4) demonstrierten den bakteriziden Effekt von Kaninchen- und Hundeblood auf Typhusbazillen und vermochten den Nachweis zu erbringen, dass die antibakteriellen Eigenschaften des Vollblutes nicht den korpuskulären Blutelementen sondern dem Serum anhaften (Alexine). Die bakteriziden Qualitäten des Kaninchenserums gegenüber Typhusbazillen wurden von A. Haussmann (5) bestätigt. Dass aber auch die Blutkörperchen für die Infektionsabwehr nicht gleichgültig sind, geht aus den Befunden von N. Hirschberg und L. Arnold (6) hervor, wonach das Wachstum von Tuberkelbazillen im Seibert'schen Nährmedium in Gegenwart von 20% Vollblut des Menschen völlig unterdrückt wird, während der Zusatz von gleichviel Plasma oder Serum lediglich eine Wachstumsverzögerung verursacht.

Mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellte Extrakte aus Thrombozyten berauben Milzbrandbazillen ihrer Proliferationsfähigkeit. Die aus den Thrombozyten gewonnenen, wirksamen Stoffe wurden von M. Gruber und K. Futaki (7) Plakanthrakozidine, von E. Barreau (8) einfach Plakine genannt.

Mit grösserem Eifer wurden Extrakte aus Kaninchenleukozyten (Leukine) untersucht, die sich im Reagenzglas als bakterizid erwiesen gegenüber Typhusbazillen, Staphylo-, Strepto-, Pneumokokken, Milzbrandbazillen, Hühnercholera-vibrionen (R. Schneider 9), ausserdem gegen Paratyphus-A- und -B-bazillen, Cholera-vibrionen (F. W. Werbitzki 10), Dysenteriebazillen (W. Meisner 11), *Pseudomonas pyocyanea* und *Escherichia coli* (O. Gengou 12).

Nach A. Fleming (13) enthalten die Leukozyten Lysozym, eine bakteriolytische Carbohydrase, die sich auch im zellfreien Blutplasma und -serum nachweisen lässt, jedoch besonders reichlich in der Tränenflüssigkeit, im Sputum und im Nasensekret des Menschen vorzukommen pflegt. Die beste Lysozymquelle ist bekanntlich das Hühnereiklar. Dieses Ferment löst den *Micrococcus lysodeiticus* (A. Fleming 13, 14), in geringem Grade auch Staphylokokken und Milzbrandbazillen (L. K. Wolff 15) und andeutungsweise *Subtilis*- und *Mesentericus*-bazillen (M. A. Gohar 16), pathogene Anaerobier (J. Melnik, M. P. Netschajewski und G. M. Starobinets 17), *Prodigiosus*-bazillen und Gonokokken (M. A. Gohar 16) auf, indem es ihre Mucopolysaccharidhülle auf hydrolytischem Wege wasserlöslich macht (L. A. Epstein und E. Chain 18). Virusarten werden durch Lysozym nicht beeinflusst (E. Scheidegger 19). Neben dem Lysozym sind in den Sekreten noch weitere antibakterielle Wirkstoffe vorhanden; so vermag die Tränenflüssigkeit nach J. Juraszynska (20) Staphylo- und Streptokokken abzutöten. Der Speichel und das Nasensekret enthalten Inhibine (H. Dold), welche das Wachstum von Diphteriebazillen (H. Dold und F. Weigmann 21), sowie von Mundpneumokokken (K. L. Pesch und R. Damm 22), Staphylo- und Streptokokken, Typhus-, Paratyphus-, Milzbrandbazillen und Choleravibrionen (H. Dold, W. Lächele und Du Dscheng Hsing 23), desgleichen von Heubazillen (H. Ignatius 24) zu hemmen vermögen. Diese Inhibine unterscheiden sich in Herkunft, Verbreitung, chemischen und physikalischen Eigenschaften deutlich vom Lysozym A. Flemings (R. P. Caflisch 25). Nach H. Dold und F. Weigmann (21), ferner F. Weigmann und A. Koehn (26) verwandeln sich Diphteriebazillen auf der Nasenschleimhaut und im Rachen von Meerschweinchen in Pseudodiphteriebazillen und auch der Speichel des Menschen soll derartige Mutationen bewirken (H. Dold und F. Weigmann 21). Kapselbakterien verlieren unter dem Einfluss des Speichels die Kapsel (M. Prica 27 und A. Berg 28). Tuberkelbazillen büßen ihr Proliferationsvermögen ein (H. Dold und F. Ochsenreither 29). K. W. Clauberg (30) und W. Schäfer (31) führen die antibakterielle Wirkung des Speichels auf seinen Salzgehalt zurück und M. Knorr (32) konnte zeigen, dass die von H. Dold und seinen Schülern beobachteten Effekte nicht auf einem Antagonismus der Speichelflora gegen die Testorganismen beruhen, indem sich auch keimfrei filtrierter Speichel als aktiv erwies, doch zeigen die antibakteriellen Eigenschaften des Speichels ganz beträchtliche individuelle Schwankungen (F. Weigmann und H. Noeske 33). Inhibine wurden auch in der Kuh- und Frauenmilch (H. Dold, E. Wizemann und C. Kleinen 34) sowie im Urin (H. Dold und F. W. Deck 35, H. Dold 36) und in der Galle (F. Neufeld 37, F. Neufeld und R. Etinger 38, R. Buttiaux und A. Chavy 39, F. Jakob 40), nicht aber im Sperma (H. Dold und P. Barczyk 41) und in geschlossenen Körperhöhlen (Peritoneal-, Pleurahöhle, Pericard, Gelenkhöhlen, Augenkammerwasser (H. Dold und G. Feigs 42) und Cerebrospinalflüssigkeit (O. B. Frantz 43) gefunden. Urin, Frauen- und Kuhmilch berauben *Prodigiosus*-bazillen, *Staphylococcus aureus haemolyticus* und *Pseudomonas pyocyanea* auch

ihres Pigmentbildungsvermögens (Mutine 34, 35). Seit langer Zeit ist die bakterizide Wirkung des Magensaftes bekannt, die sich vornehmlich gegen die Bakterien der Typhus-, Paratyphus-, Coligruppe, der Ruhrgruppe (K. Scheer 44, S. Mura 45) sowie gegen Choleravibrien (W. Kolle und R. Prigge 46), gegen Milzbrandbazillen und in geringem Masse gegen Tuberkelbazillen (J. Straus und R. Würtz 47), ferner gegen Staphylokokken (Rolli und G. Liebermeister 48) richtet und die über das Mass der antibakteriellen Wirkung der freien Salzsäure hinausgeht. L. Bogendorfer (49) sowie W. Löwenberg (50) demonstrierten den wachstumshemmenden Effekt des alkalisch reagierenden Darmsaftes auf Kulturen von Strepto-, Staphylo-, Pneumokokken und Diphtheriebazillen (Bakteriostanine). Im Organismus dürfte der Darmsaft auch bakterizide Eigenschaften entfalten. Rolli und G. Liebermeister (48) injizierten Kaninchen *Staphylococcus aureus haemolyticus*, *Metschnikoffvibrien* und *Friedländerbazillen* in eine freigelegte Darmschlinge, deren Blutzirkulation ausgeschaltet wurde, und waren nicht imstande die eingebrachten Mikroorganismen nach neun Stunden wieder aus dem Darmsaft zu isolieren. Einer noch eleganteren Methode bedient sich Ganter und van der Reis (51), welche Staphylokokken und *Prodigosus*bazillen in Neusilberkapseln von Versuchspersonen verschlucken liessen, die Wanderung der Patronen radioskopisch verfolgten, um die Kapseln an bestimmten Stellen des Darmes mit Hilfe von Magneten zu öffnen und nach dem Eintritt des Darmsaftes wieder zu verschliessen. Nachdem die Patronen im Stuhl erschienen waren, wurde ihr Inhalt bakteriologisch kontrolliert. Diese Versuche ergaben, dass der Darmsaft die Testmikroben abgetötet hatte.

Neben dem Blute, dem Serum und den geformten Blutelementen sowie den Exkreten und Sekreten kommen auch manchen Organen antibakterielle Eigenschaften zu. W. Levinthal (52) tötete Diphtheriebazillen mit frischer Trachealschleimhaut des Meerschweinchens ab und H. Dold (53) wies nach, dass die Trachealschleimhaut des Kaninchens das Wachstum von Milzbrand- und *Prodigosus*bazillen hemmt. Nach seinen Angaben enthält die Haut am meisten, die Trachea ziemlich viel, das Peritoneum wenig, die Pleura fast keine und die Aorta gar keine Inhibine gegen *Prodigosus*bazillen (54). Dolds Schüler H. Merkel (55) erkannte die wachstumshemmende Wirkung des Darmes auf Milzbrand- und *Mesentericus*bazillen, Staphylokokken sowie Typhus-, *Prodigosus*- und *Pyocyaneus*bazillen. Während die zitierten Autoren exzidierte Organstücke direkt auf die Kulturen einwirken liessen, untersuchten andere Forscher Organpressäfte. Nach H. Conradi (56) üben frische Pressäfte aus Leber, Muskel, Hoden, Lymphdrüsen und Thymus auf Milzbrand-, Typhus-, *Friedländerbazillen*, ferner Staphylo- und Streptokokken sowie Choleravibrien, *Pyocyaneus*- und *Proteus*bazillen keinen Einfluss aus. Dagegen wird das Wachstum von Tuberkelbazillen im Seibert'schen Nährmedium durch Pressaft aus Niere stark, aus Milz, Herz und Pankreas in mässigem und durch Leberpressaft in geringem Masse beeinträchtigt (N. Hirschberg und L. Arnold 6). Sogar erhitzter Herzpressaft ist aktiv. Die Pankreaswirkung ist nicht an das Insulin

gebunden, indem dieses allein das Wachstum von Tuberkelbazillen ohne weiteres erlaubt (6). Nicht ohne praktisches Interesse ist die Feststellung, dass Lungenpresssaft das Wachstum von Tuberkelbazillen nicht nur nicht hemmt sondern eher noch fördert.

Wässrige Extrakte aus Milz, Leber oder Lunge enthalten Inhibine gegen Milzbrand-, Colibazillen und Staphylokokken (O. B. Frantz 43), und eine mit Phosphatpufferlösung angeriebene Lebersuspension tötet Streptokokken der Gruppe A ab (M. N. Lewis und B. S. Schwartz 57). Mit Hilfe von physiologischer Kochsalzlösung zubereitete Auszüge aus Tonsillen hemmen das Wachstum von Diphtheriebazillen (Istvan Bezi 58, E. Carminiti 59), ebenso von Typhus- und Maltafieberbazillen (59). Analoge Präparate aus Lymphdrüsen sind ebenfalls aktiv gegen Diphtheriebazillen (58), wohingegen Nieren-, Leber- und Milzextrakte die Proliferation von Diphtheriebazillen nicht behindern (58). Tuberkelbazillen lassen sich in Gegenwart von Leberauszügen, die mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt worden sind, nicht, in Anwesenheit von Nierenextrakten nur schwer züchten, während entsprechende Zubereitungen aus Milzen wirkungslos sind (W. Sarnowiec 60). Cholera-vibrionen vermehren sich ungehindert in Gegenwart von Darmextrakten (G. Petrovanu 61). Kulturen von Diphtheriebazillen, Strepto-, Pneumo- und Staphylokokken dagegen gehen schwerer an als darmextraktfreie Kontrollkulturen (L. Bogendörfer 49).

Mit Aether, Aceton oder Benzol zubereitete Extrakte sind wirksamer als Auszüge, die mit physiologischer Kochsalzlösung oder Alkohol angesetzt werden (L. Bogendörfer 49). F. Arloing, L. Thévenot und J. Viallier (62) mazerierten Milz-, Leber-, Nieren- und Lungenstücke in Glycerinbouillon während zwölf bis vierzehn Tagen und prüften die abfiltrierte Flüssigkeit auf ihre Aktivität gegenüber Tuberkelbazillen. Das Mazerat aus Leber tötete die Testkeime ab, dasjenige aus Nieren erlaubte ihnen bloss ein kümmerliches Wachstum; der Milzauszug bewirkte eine Wachstumshemmung und der Lungenextrakt eine Wachstumsförderung. F. Arloing und seine Mitarbeiter konnten infolgedessen die Beobachtung von N. Hirschberg und L. Arnold (6) bestätigen.

L. Nutini und seine Mitarbeiter untersuchten eine grössere Anzahl alkoholischer Organextrakte (63, 64, 65, 66). Ueber ihre Aktivität gibt Tabelle 1 Aufschluss.

Tabelle 1

Testkeime	Extrakte aus					
	Milz	Frisch-leber	gefrorener Leber	Niere	Hirn	Herz
Pneumococcus Typus VII	O					
Streptococcus haemolyticus	HA					
Staphylococcus aureus haemolytic.	H ¹ M			H ¹ M	H ¹ M	H ¹ M
Mycobacterium tuberculos. virul.	H	HA		HA	HA	HA
Mycobacterium tuberculos. avirul.	H	F		F	HA	HA
Escherichia coli	F	F	F	F	F	F
Eberthella typhi	F	F	H	F	F	F
Legende: O = keine Wirkung A = Abtötung H = Wachstumshemmung H ¹ = Wachstumshemmung während 4 Tagen, später vermehrtes Wachstum M = Mutationen F = Wachstumsförderung						

Wie Typhusbazillen verhielten sich *Salmonella paratyphi* A, *Salmonella enteritidis*, *Shigella dysenteriae* Flexner und Sonne, *Bacillus proteus vulgaris* und *Bacillus faecalis alcaligenes*.

Am aktivsten war der Gehirnextrakt. Dieser verursachte nicht nur den Umschlag des goldgelben Pigmentes der Staphylokokken in einen weissen Farbstoff, sondern auch den Verlust der Haemolysin-, Toxin- und Plasmakoagulaseproduktion sowie der Fähigkeit der Mannitvergärung. Die übrigen staphylokokkenaktiven Präparate zeigten diese Effekte in schwächerem Masse. Alle diese Minusvarianten konnten jedoch durch die Züchtung der mutierten Staphylokokken auf extraktfreien Nährmedien wieder zum Verschwinden gebracht werden.

Im Gegensatz zum alkoholischen Gehirnextrakt blieben wässrige (O. B. Frantz 43) oder aetherische Auszüge (L. Bogendörfer 49) aus Gehirn gegenüber Staphylokokken und Colibazillen unwirksam. Der Pressaft übte jedoch auf Tuberkelbazillen einen wachstumshemmenden Effekt aus (N. Hirschberg und L. Arnold 6).

L. Nutini prüfte seine Extrakte ziemlich eingehend im Mäuseversuch (67, 68). Zunächst stellte er fest, dass die unter dem Einfluss des Hirnextraktes entstandene weisse Mutante von *Staphylococcus aureus haemolyticus* wesentlich weniger pathogen war als die Stammkultur. Im prophylaktisch-therapeutischen Versuch vermochte der Hirnextrakt an Mäusen subkutan, intravenös oder intraperitoneal gesetzte Infektionen mit *Staphylococcus aureus haemolyticus* günstig zu beeinflussen, indem teils die Krankheitserscheinungen überhaupt ausblieben oder lediglich in mitigierter Form auftraten; dementsprechend war auch die Krankheitsdauer verkürzt und die Mortalität sank auf einen geringen Bruchteil derjenigen der Kontrolltiere ab. Rein therapeutische Versuche waren ebenfalls erfolgreich, wenn auch im grossen und ganzen etwas weniger eindrucklich. Der Hirnextrakt wurde in der Regel während 10 bis 11 Tagen in Tagesdosen von 50 mg subkutan verabreicht; er war aber auch per os wirksam, nur mussten die Tagesdosen in diesem Falle auf 300 mg erhöht werden. Auf Grund von vergleichenden Experimenten mit Penicillin kamen L. Nutini und Mitarbeiter (69) zum Schlusse, dass Hirnextrakte an staphylokokkeninfizierten Mäusen dem Penicillin überlegen seien.

EXPERIMENTELLER TEIL

Wir versuchten nun die antibakteriellen Eigenschaften des Gehirnes nachzuprüfen. Zu diesem Zwecke stellten wir nach der von L. Nutini beschriebenen Methode Extrakte aus Rinder-, Schweine-, Schaf- und Pferdehirnen dar. L. Nutini entfernte die Proteine durch Alkoholfällung (63). In der Meinung, eventuell wirksamere Extrakte zu gewinnen, entfernten wir die Eiweisskörper in spätern Versuchen durch Hitze-koagulation. Im Hinblick auf die Agnoszierung und Isolierung des wirk-samen Prinzipes wurden ein enteweisster, wässriger Extrakt, eine dialysierte und eine neutralisierte Kohlehydratfraktion, sowie Protein-, Lipoid- und Nucleoproteinfraktionen aus Gehirnen zubereitet und wie die übrigen Auszüge auf ihre antibakterielle Aktivität in vitro und teilweise auch in vivo gegenüber *Staphylococcus aureus haemolyticus* und andern Testbakterien geprüft.

Herstellung der Extrakte:

1. Extrakt nach L. Nutini:

Bei der Darstellung hielten wir uns genau an die angegebene Methode (63). Ausser dem Originalextrakt wurden verschiedene Varianten dargestellt, wobei die Gehirne teils frisch verarbeitet, teils nach 2 bis 4 Tage dauernder Lagerung bei Zimmertemperatur, teils ohne Einfrieren, teils nach ein- bis sechsmaligem Einfrieren und Wiederauftauen aufgearbeitet wurden.

2. Eigener Extrakt:

Vier Gehirne frisch geschlachteter Rinder werden vom anhaftenden Blute gesäubert, mit der gleichen Gewichtsmenge destilliertem Wasser im Turmix angerieben und anschliessend unter ständigem Rühren auf dem Wasserbade auf 84 ° C erwärmt. Dann wird kaltgerührt, die Flüssigkeit mit der Sanapress abgepresst, durch ein Papierfilter, nachher durch eine Seitz-Entkeimungsschicht filtriert und die schwach gelb gefärbte Lösung in Ampullen abgefüllt. Die Trocknung dieses Fluidextraktes am Flosdorfgerät ergibt eine gelbliche, krümelige, hygroskopische Masse mit einer Ausbeute von 1,2 %.

3. Enteweisster, wässriger Extrakt und Fraktionen:

a) Enteweisster, wässriger Extrakt:

Wir verreiben 400 gr Rinderhirn im Mörser mit Sand zu einem homogenen Brei, versetzen diesen mit 400 ccm destilliertem Wasser und zentrifugieren während 20 Minuten bei 3000 Touren. Das Sediment wird verworfen. Zu der überstehenden, rötlich gefärbten Flüssigkeit geben wir das anderthalbfache Volumen 96-prozentigen Alkohol und lassen über Nacht im Eisschrank stehen. Dann wird das Präzipitat abzentrifugiert und verworfen, die Lösung in Ampullen abgefüllt, eingefroren und am Hochvakuum getrocknet. Aus 100 ccm Lösung erhalten wir so 0,56 gr einer gelblichen, hygroskopischen Masse.

b) *Proteinfraktion:*

Wir verreiben 200 gr frische Hirnsubstanz mit etwas Sand im Mörser, mischen mit der gleichen Menge destilliertem Wasser und zentrifugieren. Das Sediment wird verworfen. Wir versetzen 100 ccm der überstehenden Flüssigkeit mit 100 ccm einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung und zentrifugieren den Niederschlag nach 2 Stunden ab. Zu der fast klaren, rötlichen Lösung wird kristallisiertes Ammoniumsulfat bis zur Sättigung zugegeben, das Präzipitat erneut abzentrifugiert, mit dem Niederschlag der Halbsättigung vereinigt und in 60 ccm destilliertem Wasser aufgenommen. Diese Lösung wird in Cellophansäckchen bis zur Sulfatfreiheit gegen strömendes Wasser dialysiert, wobei sie schwach zu opaleszieren beginnt. Nachher füllen wir dieses Dialysat in Ampullen ab und trocknen es am Flosdorfgerät. Die trockene, schwach rötliche Substanz wiegt 0,3 gr.

c) *Kohlehydratfraktionen:*

aa) dialysiert:

364 gr frisches Rinderhirn werden fein gehackt, mit der gleichen Menge Wasser verrieben und mit 364 ccm normaler Trichloressigsäure versetzt. Dann lassen wir während sechs Stunden unter öfterem Umrühren stehen und filtrieren die festen Bestandteile, die nicht weiter verarbeitet werden, ab. Wir verteilen das klare, schwach grünblau gefärbte Filtrat auf fünf Cellophansäckchen und unterwerfen es solange der Dialyse gegen strömendes Wasser bis das pH den Wert von 6,7 erreicht hat. Zu 100 ccm Dialysat fügen wir 250 ccm 96-prozentigen Alkohol, zentrifugieren den Niederschlag ab und lösen denselben wieder in destilliertem Wasser auf. Dieser Reinigungsprozess wird noch zweimal wiederholt und schliesslich die Fällung über Silikagel getrocknet. Das bläulich-weiße Pulver wiegt 0,009 gr.

bb) neutralisiert:

Die mit Trichloressigsäure angesäuerte Hirnaufschwemmung wird filtriert und das Filtrat nach den Angaben von A. Boivin (70) mit einer 10-prozentigen Sodalösung neutralisiert.

d) *Lipoidfraktion:*

300 gr frisches, mit etwas Sand verriebenes Rinderhirn werden mit 300 ccm destilliertem Wasser versetzt. Wir zentrifugieren die festen Bestandteile ab und verfolgen sie nicht weiter. Die überstehende Flüssigkeit wird mit dem gleichen Volumen Chloroform geschüttelt, wobei sich eine Emulsion bildet. Um diese rascher zu zerlegen, wird während 10 Minuten bei 3000 Touren zentrifugiert. Nun treten drei Schichten auf: zu unterst sammelt sich der klare Chloroformextrakt an, darüber liegt eine dünne Schicht von Zellen und kleinen Gewebstrümmern, die von der klaren, wässrigen Phase überlagert wird. Die beiden oberen Schichten werden verworfen, der Chloroformauszug dagegen in Ampullen abgefüllt und am Flosdorfapparat getrocknet. Die Ausbeute beträgt 0,02 %.

e) *Nucleoproteinfraktion:*

Die Gewinnung der Nucleoproteine erfolgt nach der von J. F. Huddleson (71) für die Darstellung dieser Substanzen aus Brucellen geschilderten Methode:

480 gr Rinderhirn werden mit Sand verrieben, in 480 ccm destilliertem Wasser aufgeschwemmt und zentrifugiert. Das Sediment wird verworfen. Wir stellen die überstehende Flüssigkeit mit 5-prozentiger Essigsäure auf ein pH von 3,9 ein und bewahren sie während 12 Stunden im Kühlschrank auf. Während dieser Zeit bildet sich ein feiner Niederschlag, den wir bei 3000 Touren ausschleudern und in der Folge in wenig $\frac{1}{10}$ normaler Natronlauge bei pH 6,8 aufnehmen. Weil er sich in diesem Milieu nicht vollständig löst, wird nochmals zentrifugiert. Nach der Eliminierung der unlöslichen Anteile werden die Nucleoproteine erneut mit Hilfe von Essigsäure gefällt. Diese Reinigung wiederholen wir noch zweimal, wodurch die vorher graubraun gefärbte Masse fast weiss wird. Wir lösen diese in 10 ccm $\frac{1}{10}$ normaler Natronlauge und trocknen am Flosdorfapparat. Wir gewinnen auf diese Weise 0,016 gr Nucleoproteine.

Die chemischen Eigenschaften der Extrakte sind aus der Tabelle 2 ersichtlich.

Tabelle 2

Reaktionen	Extrakte							
	1	2	3 a	3 b	3 c		3 d	3 e
					aa	bb		
<i>I. Auf Eiweiss und Aminosäuren</i>								
Kochprobe	—	—	—	+	—	—	—	—
Esbach	—	—	—	+	—	—	—	—
Trichloressigsäure	(±)	(±)	—	+	—	—	—	—
Sulfosalicylsäure	(±)	(±)	—	+	—	—	—	—
Biuret	±	±	(±)	+	—	—	—	—
Xanthoprotein	—	—	—	+				—
Tryptophan	±	±	±	+				—
Histidin	?	?	?	+				—
Cystin	?	?	?	±				—
<i>II. Auf Kohlehydrate</i>								
Fehling	?	?	?	—	(±)	(±)	—	—
Nylander	—	?	—	—	±	±	—	—
Fuchsin-schweflige Säure	—	—	—		—	—		
Molisch	?	?	?		±	±		
<i>III. Auf Lipoide</i>								
Salkowski	—	—	—	—	—	—	±	—
Liebermann	?	—	?				+	
<i>IV. Auf Nucleoproteine*</i>								
Löslichkeit in Essigsäure				—				+
Nach Hydrolyse mit Schwefelsäure:								
Molisch	?	?	?	—	(±)	(±)		±
Phosphatnachweis	—	—	—	—	—	—	—	(±)
Purinbasen	—	—	—	—	—	—	—	?

* = Reaktionen nach den Vorschriften von J. Abelin (72).

Die antibakteriellen Eigenschaften der Extrakte

1. Versuche in vitro:

Für die Bestimmung der antibakteriellen Aktivität der verschiedenen Extrakte verwendeten wir stets eine Kultur von *Staphylococcus aureus* haemolyticus, in einem Falle auch noch eine solche von *Escherichia coli* und *Pseudomonas pyocyanea*. Bei allen drei Keimen handelte es

sich um Stämme, die durch die Untersuchungsabteilung des hygienischen Institutes der Universität Bern frisch aus pathologischen Ausscheidungen des Menschen isoliert worden waren.

a) *Methode der Wertbemessung:*

Wir bedienten uns der von B. Fust für die Auswertung von Antibiotica am hygienischen Institut der Universität Bern geübten Methode, die wir für unsere Zwecke leicht modifizierten:

Eine 18 bis 20 Stunden alte Ascites-Schrägagarkultur des Keimes wird mit Phosphatpufferlösung (pH = 7,0) vom Nährboden abgeschwemmt, die Suspension durch Gaze filtriert und die Dichtigkeit der Aufschwemmung mit weiterem Phosphatpuffer auf Frischmilch 1 : 100 eingestellt. Hierauf verdünnen wir mit Pufferlösung in Zehnerpotenzen bis 1 : 10 Millionen. Mit Hilfe eines Drigalskipatels werden 0,1 ccm dieser sechs Keimverdünnungen auf je einer Agarplatte gleichmässig verteilt und während 1 bis 2 Stunden im Brutschrank leicht angetrocknet. Auf den beimpften Platten wird mit einem Zentrifugenglas in der Mitte ein Loch ausgestanzt und in den ausgestanzten Raum 0,1 ccm der zu prüfenden Extraktlösung, bei den Kontrollen 0,1 ccm Phosphatpufferlösung, eingefüllt. Die Bebrütung erfolgt während 16 Stunden bei 37° C, worauf die Ablesung vorgenommen wird.

b) *Ergebnisse:*

Wie L. Nutini konnten wir feststellen, dass Extrakte aus einem Gemisch mehrerer tierischer Gehirne *Staphylococcus aureus haemolyticus* das Pigmentbildungsvermögen berauben. Um den ausgestanzten Bezirk herum wuchsen die goldgelben Staphylokokken als weisser Rasen, während in grösserer Entfernung die Pigmentbildung normal war. Wurden diese weissen Keime wieder auf extraktfreie Nährböden überimpft, so bildeten sie erneut den gelben Farbstoff. In der nachstehenden Tabelle 3 sind die Flächenmasse der durch die einzelnen Extrakte verursachten weissen Zonen in mm² angegeben.

Tabelle 3

Extrakte	Fläche des weissen Hofes in mm ² bei der Keimverdünnung					
	1	2	3	4	5	6 §
1. Extrakte aus Rinderhirn nach Nutini						
a) Original	314	283	380	416	416	ca. 420*
b) Original ohne Einfrieren	ca. 100*	135*	170*	160*	190*	180*
c) Original, Organe vor der Verarbeitung 2 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt	64	79	113	123	143	143
d) wie c) mit sechsmaligem Einfrieren	20	20	28	28	38	44
2. Eigener Extrakt aus Rinderhirn	111	112	266	305	349	ca. 368*
3. Enteiweisster, wässriger Extrakt und Fraktionen						
a) enteiweisster, wässriger Extrakt	158	172	196	212	261	ca. 305*
b) Proteinfraction	—	—	—	—	—	—
c) Kohlehydratfraktionen	—	—	—	—	—	—
d) Lipoidfraktion	—	—	—	—	—	—
e) Nucleoproteine	—	—	—	—	—	—
4. Original aus Kalbshirn	50	95	71	113	132	ca. 144*
5. Original aus Schweinehirn	268	346	330	ca. 355*	350*	360*
6. Original aus Schafhirn	95	95	103	95	113	ca. 120*
7. Original aus Pferdehirn	38	95	ca. 48*	59	56	ca. 81*
Legende: § = die Zahlen 1—6 sind für die Keimverdünnungen 1:100, 1:1000, 1:10'000, 1:100'000, 1:1'000'000 und 1:10'000'000 eingesetzt. * = die Abgrenzung der weissen Zone gegenüber der übrigen gelben Fläche war hier so undeutlich, dass sie nicht genau ausgemessen werden konnte.						

Aus dieser Aufstellung geht deutlich hervor, dass der Extrakt nach L. Nutini die grösste Mutinwirkung entfaltet. Wir stellten neben den drei in Tabelle 3 erwähnten modifizierten Extrakten noch sechs weitere her, indem wir den Organbrei statt dreimal, ein-, zwei-, vier-, fünf- und sechsmal einfroren, ferner die Gehirne vor der Verarbeitung vier Tage liegen liessen, konnten aber auch dadurch die Wirkung nicht steigern.

Unser eigener Extrakt erwies sich ebenfalls als aktiv, wodurch bewiesen wird, dass das von L. Nutini gefundene aktive Prinzip wasserlös-

lich ist und dass der Alkohol bei der Extraktion kaum eine Rolle spielt. Die relativ geringere Aktivität unseres eigenen Extraktes dürfte sich daraus erklären, dass bei der Hitzekoagulation der Eiweisskörper auch ein Teil der Mutine mitgerissen wird.

Weder die Proteine, noch die Kohlehydrate, Lipaide oder Nucleoproteine beeinflussten im Plattenversuch die Staphylokokken. Diese Fraktionen enthalten daher den Wirkstoff nicht; es ist infolgedessen anzunehmen, dass er bei der Präparation verloren geht.

Schliesslich wurde auch noch untersucht, ob das Alter oder die Spezieszugehörigkeit für den Gehalt des Gehirns an dem Nutini'schen Faktor massgeblich sei. Extrakte aus Kalbs-, Schweine-, Schaf- und Pferdegehirn waren weniger aktiv als der Rinderhirnextrakt, obwohl sie nach der gleichen Methode zubereitet waren.

Erwähnt sei ferner, dass wir im Verlauf unserer Untersuchungen neben einem Gemisch mehrerer Gehirne verschiedentlich auch Einzelhirne extrahierten. Diese Extrakte zeigten sehr grosse Wirkungsschwankungen, indem derselbe Extrakt aus drei verschiedenen Einzelhirnen einmal eine Wachstumshemmung und Pigmentänderung, einmal nur eine Wachstumshemmung und im dritten Fall gar keinen Effekt bewirkte. Diese Differenzen dürften auf individuelle Unterschiede der Tiere in ihrer Abwehrkraft zurückzuführen sein.

Alle Extrakte zeigten aber entgegen den Angaben von L. Nutini keine Beeinflussung von Plasmakoagulase-, Haemolysin-, und Gelatinasebildung sowie der Mannitvergärung des *Staphylococcus aureus haemolyticus*.

Bei *Escherichia coli* konnten wir mit unserm Extrakt wie L. Nutini mit seinem Auszug weder das Wachstum noch das Zuckerabbauvermögen beeinflussen und auch *Pseudomonas pyocyanea* entwickelte sich unter Extrakteinfluss ungehemmt.

2. Versuche in vivo:

a) Toxizität:

Der eigene, durch Hitzekoagulation enteweisste Extrakt wird in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und weissen Mäusen von 14,5 gr Gewicht intraperitoneal injiziert. 10 Minuten nach der Injektion von 125 mg Extrakt zeigen die Tiere schwere Dyspnoe und Krämpfe und gehen innert 15 Minuten zugrunde. Die Sektion ergibt keine organischen Veränderungen. Geringere Dosen bewirken ebenfalls Atemnot und Krämpfe, führen aber nicht zum Tode. Die Dosis reagens minima beträgt 5,8 mg Extrakt. Die Tiere zeigen leicht gesträubtes Haarkleid und angedeutet erschwerte Atmung, beginnen aber bereits nach 10 Minuten wieder zu fressen. Diese Dosis wurde anschliessend zur subkutanen Behandlung von mit Staphylokokken infizierten Mäusen verwendet. Die grösste, intraperitoneal verträgliche Dosis beträgt für Mäuse 3,1 mg. In Tabelle 4 sind die minimale, intraperitoneal letale Dosis (D. l. m.), die kleinste, intraperitoneal Vergiftungssymptome erzeugende (D. r. m.) und die grösste, intraperitoneal verträgliche Menge (D. c. i. m.) für weisse Mäuse pro 1000 gr Körpergewicht angegeben.

Tabelle 4

D. l. m.	=	8620 mg	pro 1000 gr Körpergewicht für weisse Mäuse
D. r. m.	=	400 mg	
D. c. i. m.	=	213 mg	

b) Prophylaktisch-therapeutische Versuche:

An zwei aufeinanderfolgenden Tagen werden 45 weissen Mäusen je 0,5 ccm einer Lösung von 1,2 % Extrakt in physiologischer Kochsalzlösung subkutan injiziert. 45 Kontrolltiere erhalten die gleiche Menge physiologischer Kochsalzlösung. Am dritten Tage werden alle Tiere mit je 0,5 ccm einer Staphylokokkensuspension subkutan infiziert. Das Impfmateriel besteht aus 2 Oesen einer 48-stündigen Ascitesagarkultur in 3 ccm Phosphatpufferlösung. Die Tiere erhalten alsdann noch weitere 4 ccm Extraktlösung resp. Kochsalzlösung in täglichen Dosen von je 0,5 ccm. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse dieses Versuches zusammengefasst.

Tabelle 5

Tiere	Morbidität		Mortalität		mittlere Lebensdauer der Toten	mittlere Heilungsdauer der Ueberlebenden
	absolut	relativ	absolut	relativ		
Versuch	42/45*	93,34 %	16/45*	35,5 %	9,2 Tage	22,5 Tage
Kontrolle	45/45*	100 %	26/45*	57,7 %	12,0 Tage	34,1 Tage

Legende: * : Zähler = Anzahl der erkrankten resp. gestorbenen Tiere.
 Nenner = Anzahl der verwendeten Tiere.

Während die Morbidität und die Mortalität nur schwach beeinflusst wurden und die Differenzen als statistisch nicht gesichert betrachtet werden müssen, ist die Beeinflussung der Heilungsdauer offensichtlicher. Doch ist auch dieses Resultat nicht signifikant, da die Wahrscheinlichkeit kleiner als 99,95 % ist (berechnet nach der Formel für t von A. Linder 73). Die Ueberlebensdauer der gestorbenen Tiere zeigt bei den Kontrollmäusen einen höhern Wert, da infolge Rückfällen nach 20 Tagen nochmals 8 Tiere eingingen. Die Infektion mit Staphylokokken als Todesursache wurde bei allen Tieren durch Anlegen einer Kultur aus dem Herzblut nachgewiesen.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Nach Alkoholfällung der Eiweisskörper lässt sich aus einer wässrigen Suspension von Rinderhirn ein Extrakt herstellen, welcher *Staphylococcus aureus haemolyticus* zur Bildung eines weissen Pigmentes veranlasst. Nach Rücküberimpfung auf extraktfreie Nährmedien wird die ursprüngliche Pigmentproduktion wieder zurückgewonnen. Dieser Befund bestätigt die Angabe Nutinis über die Mutinwirkung derartiger Hirnextrakte. Dagegen konnten weitere Beobachtungen des gleichen Autors über den Verlust der Plasmakoagulase-, Haemolysin- und Gelatinasebildung und des Mannitvergärungsvermögens nicht reproduziert werden.
2. Versuche die Aktivität des Nutini'schen Extraktes durch Modifikation der Aufarbeitung — kürzeres oder längeres Einfrieren, kürzeres oder längeres Lagern der Gehirne bei Zimmertemperatur — zu steigern, ergaben negative Resultate.
3. Extrakte aus Kalbshirn waren weniger aktiv als entsprechende Auszüge aus Rinderhirn. Das Gehirn älterer Tiere enthält infolgedessen mehr Mutin als das jugendlicher Individuen.
4. Extrakte aus einzelnen Rinderhirnen zeigten in Bezug auf die Mutinwirkung grosse individuelle Schwankungen.
5. Extrakte aus Schweine-, Schaf- und Pferdehirnen erwiesen sich als weniger aktiv als Auszüge aus Rinderhirnen.
6. Aus wässrigen, durch Hitzeoagulation enteiweissten Aufschwemmungen von Rinderhirnen konnte ein Extrakt gewonnen werden, dessen Mutinaktivität etwa 75 % des Nutini'schen Extraktes erreichte. Die wirksame Substanz dürfte daher wasserlöslich sein. Zu ihrer Isolierung ist der Alkohol entbehrlich.
7. Protein-, Kohlehydrat-, Lipoid- und Nucleoproteinfraktionen aus Rinderhirn sind frei von Mutinen.
8. Die Mortalität und die Heilungsdauer von mit Staphylokokken subkutan infizierten Mäusen werden durch die prophylaktisch-therapeutische Anwendung des nach Hitzeoagulation der Eiweisskörper aus dem Rindergehirn gewonnenen Extraktes günstig beeinflusst; doch sind die Ergebnisse im Verhältnis zu den unbehandelten Kontrolltieren statistisch nicht signifikant. Dem Hirnextrakt kommt daher kaum eine therapeutische Bedeutung zu.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 v. Fodor J.: Arch. f. Hyg. 4, 129 (1886).
- 2 Conradi H.: Z. f. Hyg. 34, 185 (1900).
- 3 Nuttall G.: Z. f. Hyg. 4, 353 (1888).
- 4 Buchner H. u. Orthenberger M.: Arch. f. Hyg. 10, 84 (1890).
- 5 Haussmann A.: Arch. f. Hyg. 95, 69 (1925).
- 6 Hirschberg N. u. Arnold L.: Am. Rev. Tbc. 37, 598 (1938).
- 7 Gruber M. u. Futaki K.: D. m. Wschr. 33, 1588 (1907).
- 8 Barreau E.: Arch. f. Hyg. 70, 335 (1909).
- 9 Schneider R.: Arch. f. Hyg. 70, 40 (1909).
- 10 Werbitzki F. W.: Arch. f. Hyg. 70, 299 (1909).
- 11 Meisner W.: Z. f. Hyg. 72, 313 (1912).
- 12 Gengou O.: Annal. Inst. Past. 35, 498 (1921).
- 13 Fleming A.: Proc. Roy. Soc. B 94, 142 (1923).
- 14 Fleming A.: Proc. Roy. Soc. B 93, 306 (1922).
- 15 Wolff L. K.: Z. f. Immunf. 50, 88 (1927).
- 16 Gohar M. A.: Zbl. f. Bakt. 119, 240 (1930).
- 17 Melnik J., Netschajewski M. u. Starobinetz M.: Bull. Inst. Past. 35, 1080 (1937).
- 18 Epstein L. A. u. Chain E.: J. exp. Med. 26, 339 (1940).
- 19 Scheidegger E.: Arch. Ges. Virusf. 1, 354 (1940).
- 20 Juraszynska J.: Bull. Inst. Past. 38, 441 (1938).
- 21 Dold H. u. Weigmann F.: Z. f. Hyg. 116, 158 (1935).
- 22 Pesch K. L. u. Damm R.: Z. f. Hyg. 118, 1 (1936).
- 23 Dold H., Lächele W. u. Du Dscheng Hsing: Z. f. Hyg. 118, 369 (1936).
- 24 Ignatius A.: Z. f. Hyg. 118, 445 (1936).
- 25 Caflisch R. P.: Les substances bactéricides du liquide buccal, F. Roth Lausanne 1948, 113.
- 26 Weigmann F. u. Koehn A.: Z. f. Hyg. 118, 516 (1936).
- 27 Prica M.: Z. f. Hyg. 119, 306 (1937).
- 28 Berg A.: Z. f. Hyg. 120, 450 (1938).
- 29 Dold H. u. Ochsenreither F.: Z. f. Hyg. 123, 51 (1942).
- 30 Clauberg K. W.: Zbl. f. Bakt. 134, 96 (1935).
- 31 Schäfer W.: Zbl. f. Bakt. 135, 458 (1935/36).
- 32 Knorr M.: Arch. f. Hyg. 126, 59 (1941).
- 33 Weigmann F. u. Noeske H.: Z. f. Hyg. 119, 413 (1937).
- 34 Dold H., Wizemann E. u. Kleinen C.: Z. f. Hyg.: 119, 525 (1937).
- 35 Dold H. u. Deck F. W.: Z. f. Hyg. 123, 383 (1942).
- 36 Dold H.: Z. f. Hyg. 127, 304 (1947).
- 37 Neufeld F.: Z. f. Hyg. 34, 454 (1900).
- 38 Neufeld F. u. Etinger R.: Arch. f. Hyg. 103, 107 (1930).
- 39 Buttiaux R. u. Chavy A.: Cpt. rend. soc. biol. 107, 314 (1931).
- 40 Jakob Friedr. Diss. Freiburg 1937.
- 41 Dold H. u. Barczyk P.: Z. f. Hyg. 123, 494 (1942).
- 42 Dold H. u. Feigs G.: Z. f. Hyg. 122, 692 (1940).
- 43 Frantz O. B.: Arch. f. Hyg. 110, 143 (1933).

- 44 Scheer K.: Arch. f. Hyg. 88, 130 (1919).
- 45 Mura S.: Zbl. f. Bakt. 56, 305 (1913).
- 46 Kolle W. u. Prigge R.: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen.
- 47 Straus J. u. Würtz R.: Arch. méd. exp. 1, 371 (1889).
- 48 Rolli u. Liebermeier G.: D. Arch. klin. Med. 83, 413 (1905).
- 49 Bogendörfer L.: Z. ges. exp. Med. 41, 637 (1924).
- 50 Löwenberg W.: D. med. Wschr. 52, 1767 (1926).
- 51 Ganter u. van der Reis: D. Arch. klin. Med. 137, 348 (1921).
- 52 Levinthal W.: Z. f. Hyg. 110, 182 (1929).
- 53 Dold H.: Z. f. Hyg. 124, 597 (1943).
- 54 Dold H.: Z. f. Hyg. 127, 296 (1947/48).
- 55 Merkel H.: Z. f. Hyg. 122, 425 (1940).
- 56 Conradi H.: Beitr. chem. Physiol. u. Pathol. 1, 193 (1902).
- 57 Lewis M. N. u. Schwartz B. S.: Experientia 5, 475 (1949).
- 58 Bezi Istvan: J. Immunology 22, 1 (1932).
- 59 Carminiti E.: Ann. Igiene 49, 654 (1939).
- 60 Sarnowiec W.: Z. f. Tuberkulose 82, 101 (1939).
- 61 Petrovanu G.: Cpt. rend. soc. biol. 91, 754 (1924).
- 62 Arloing F., Thévenot L. u. Viallier J.: Cpt. rend. soc. biol. 124, 164 (1937).
- 63 Nutini L. u. Kreke C.: J. Bact. 44, 661 (1942).
- 64 Nutini L., Kreke C. u. Schroeder P.: J. Bact. 50, 177 (1945).
- 65 Nutini L., Hennessey M. u. Lynch E.: Stud. Inst. Divi Thomae 4, 97 (1945).
- 66 Nutini L., Thomas G. u. Smolar J.: Stud. Inst. Divi Thomae 4, 115 (1945).
- 67 Nutini L. u. Lynch E.: Nature 156, 419 (1945).
- 68 Nutini L. u. Lynch E.: J. exp. Med. 84, 247 (1946).
- 69 Nutini L. u. Lynch E.: J. Bact. 52, 681 (1946).
- 70 Boivin A. u. Mesrobianu L.: Rev. Imm. 1, 553 (1935).
- 71 Huddleson J. F.: Brucellosis in Man and Animals, The Common Wealth Fund, New York 1943, 245.
- 72 Abelin J.: Einführung in die experimentelle chemische Physiologie, A. Francke Bern 1944, 93.
- 73 Linder A.: Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure, Birkhäuser Basel 1945.

